

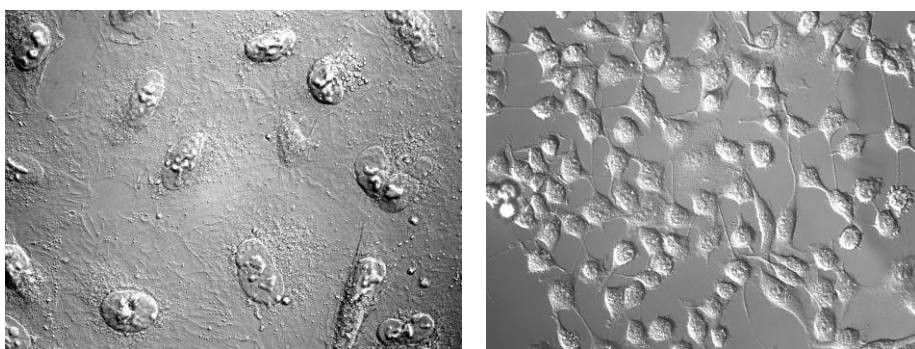
BIOLOGIA KOMÓRKI

Hodowle komórek *in vitro*

WSTĘP

Jedną z najczęściej stosowanych we współczesnej biologii technik laboratoryjnych są hodowle komórkowe *in vitro*. Strategia ta oparta jest na inkubacji, względnie namnażaniu komórek roślinnych i zwierzęcych poza organizmem. Jedną z największych korzyści płynących ze stosowania techniki hodowli komórkowych jest możliwość ścisłego kontrolowania warunków doświadczalnych i stosunkowa łatwość modyfikacji właściwości mikrośrodowiska komórek poprzez aplikację substancji biologicznie czynnych (np. hormonów, czynników wzrostowych, białek macierzy zewnątrzkomórkowej itd.), celem wszechstronnych analiz ich aktywności biologicznej.

Stosowanie hodowli komórek *in vitro* umożliwia prowadzenie całych cykli doświadczeń przy użyciu takiego samego materiału biologicznego (Ryc. 1) oraz stwarza warunki do porównywania wyników badań prowadzonych przez różne pracownie.



Rycina 1. Hodowle komórek linii melanoma M10 (z lewej) i B16 (z prawej) w stadium gotowym do pasażu (czytaj dalej).

Spore znaczenie mają również uwarunkowania ekonomiczne, gdyż eksperymenty wykorzystujące komórki hodowane *in vitro* są z reguły tańsze od analogicznych doświadczeń prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych. Nie oznacza to jednak, że techniki *in vitro* w pełni zastępują techniki *in vivo*, gdyż należy pamiętać, że komórki w hodowlach przebywają w warunkach dla nich sztucznych, a więc ich reakcje na zadany bodziec również mogą być „sztuczne”, czyli ilościowo i jakościowo odbiegające od tych potencjalnie obserwowanych w warunkach *in vivo*. Ponadto w zależności od pochodzenia, populacje komórek w hodowlach mogą mieć charakter mniej lub bardziej heterogeny, co również może mieć przełożenie na wynik doświadczenia i jego interpretację. Oznacza to, że analizy *in vitro* i *in vivo* mają charakter wzajemnie dopełniający się (komplementarny).

Z drugiej strony przy użyciu technik *in vitro* można przeprowadzać bardzo wiele doświadczeń z wykorzystaniem strategii trudnych technicznie lub niemożliwych do wykonania *in vivo*, na przykład analizy migracji pojedynczych komórek, określenie zależności wzrostu i różnicowania komórek od typu białka macierzy międzykomórkowej, kwantyfikację komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych lub oznaczenie fazy cyklu komórkowego, w której nastąpiło zatrzymanie proliferacji komórek pod wpływem danej substancji biologicznie aktywnej.

Hodowle komórkowe - metodyka

W hodowlach *in vitro* przetrzymywać można zarówno komórki aktywnie namnażające się jak i komórki terminalnie zróżnicowane, które zwykle zatraciły zdolność do proliferacji. O ile w drugim przypadku metodyka hodowli sprowadza się do izolacji specyficznej tkankowo i

jednolitej fenotypowo populacji komórek i umiejętnej jej inkubacji *in vitro*, o tyle komórki aktywnie namnażające się, a więc dysponujące potencjałem mitotycznym, można propagować *in vitro*, zapewniając im warunki hodowli korzystne dla proliferacji. Dzięki temu jesteśmy w stanie namnażać materiał biologiczny potrzebny do doświadczeń, przy zachowaniu jego cech fizjologicznych. W przypadku hodowli komórek dzielących się, a więc aktywnych mitotycznie, podstawową czynnością umożliwiającą namnożenie materiału biologicznego potrzebnego do doświadczeń jest tzw. PASAŻ, czyli przeniesienie komórek z jednego naczynia hodowlanego do jednego lub kilku następnych. Łączy się to z redukcją liczby komórek przypadającej na pole powierzchni naczynia (np. komórki prawidłowe - hamowane kontaktowo), lub objętość pożywki (np. komórki nowotworowe hodowane w zawiesinie).

CEL ĆWICZENIA

Celem proponowanego doświadczenia jest zapoznanie się z podstawowymi czynnościami związanymi z prowadzeniem hodowli komórkowych.

WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Upewnić się czy komory laminarne są przygotowane do pracy w warunkach jałowych.
2. Ustawić mikroskopy kontrastowo-fazowe.
3. Zapoznać się rozmieszczeniem sprzętu i odczynników potrzebnych do wykonania pasażu komórek (pipet, końcówek, pojemników na zlewki, pojemników na zużyte końcówki, spirytusu, naczyń hodowlanych, probówek, pożywek i innych roztworów niezbędnych do pasażu).
4. Wykonać pasaż komórek hodowanych w otrzymanym naczyniu:
 - a) ocenić gęstość komórek w hodowli pod mikroskopem odwróconym, jak również obserwując „pod światło” dno naczynia hodowlanego,
 - b) z naczynia zlać płyn hodowlany,
 - c) delikatnie zalać komórki ok. 1 ml roztworu PBS (objętość ta jest zmienna i zależy od wielkości naczynia - ma wystarczyć by przykryć całą powierzchnię dna naczynia), przepłukać je, po czym roztwór odciągnąć,
 - d) komórki zalać ok. 1 ml roztworu 0.25% trypsyny (tak by przykryć dno naczynia) i inkubować w obecności trypsyny od 20 sekund do 2 minut, kontrolując (pod światło” stopień odrywania się komórek od podłoża, ewentualnie naczynie wstrząsnąć celem przyspieszenia procesu).

Uwaga: czas trypsynizacji zależy od aktywności trypsyny i typu oraz „kondycji” komórek,

 - e) natychmiast po oderwaniu się komórek od podłoża (obserwowanym „pod światło” lub w mikroskopie odwróconym), komórki zawiesić w objętości pożywki hodowlanej (MEM + 5% surowicy cielęcej + antybiotyki) równej objętości wcześniej dodanej trypsyny; w ten sposób inaktywujemy trypsynę,

- f) uzyskaną zawiesinę przenieść pipetą do probówki i wirować 5 min. przy 1000 obr./min,
- g) po odwirowaniu nadsącz zlać, osad komórkowy zalać 1 ml świeżej pożywki, a komórki dokładnie rozpipetować,
- h) oznaczyć gęstość zawiesiny komórek w komorze Bürkera (wedle schematu uzgodnionego wcześniej w obrębie zespołów),
- i) do naczynia hodowlanego odpipetować 4 ml pożywki hodowlanej, a następnie dodać zawiesinę komórek w objętościach zawierających 250 tys komórek. Naczynia zakręcić, podpisać i przenieść do inkubatora.

ZAKRES MATERIAŁU OBOWIĄZUJĄCY DO ĆWICZEŃ:

1. „Hodowla komórek i tkanek *in vitro*”. CYTOFIZJOLOGIA pod redakcją K.Ostrowskiego i J.Kawiaka. 1990; rozdz II, str 49-63;
2. „Metody badań budowy i funkcji komórek”. SEMINARIA Z CYTOFIZJOLOGII pod redakcją J.Kawiaka i M.Zabła. 2002; rozdz 14, str 364-9;
3. „Oddziaływanie komórek z podłożem i sąsiednimi komórkami”. PODSTAWY CYTOFIZJOLOGII pod redakcją J Kawiaka i wsp.. 1998. str. 488-504
4. OBSŁUGA KOMORY BURKERA